Aus dem Hygienisch-Bakteriologischen Institut der Universität Bern
(Direktor: Prof. Dr. C. Hallauer)

Experimentelle Untersuchungen über die Eignung von Alauntoxoiden zur aktiven Immunisierung gegen Gasbrand

---

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Doctor medicinæ
der Universität Bern

vorgelegt von

Jean-Pierre Crosetti
aus Neuenburg

Bern — Buchdruckerei Gustav Grunau & Cie. — 1944

Aus dem Hygienisch-Bakteriologischen Institut der Universität Bern
(Direktor: Prof. Dr. C. Hallauer)

Experimentelle Untersuchungen über die Eignung von Alauntoxoiden zur aktiven Immunisierung gegen Gasbrand

---

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Doctor medicinæ
der Universität Bern

vorgelegt von

Jean-Pierre Crosetti
aus Neuenburg

Bern — Buchdruckerei Gustav Grunau & Cie. — 1944

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Auf Antrag des Herrn Prof. Dr. C. Hallauer von der medizinischen Fakultät zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, im Mai 1944

Der Dekan der Mediz. Fakultät:
Prof. Dr. E. Glanzmann

Einleitung

Ueber die Wünschbarkeit einer aktiven Schutzimpfung gegen Gasbrand besteht kein Zweifel. Im Felde würde einer wirksamen Gasbrandimpfung noch eine grössere Bedeutung wie der Schutzimpfung gegen Tetanus zukommen, da Gasbrandinfektionen im Anschluss an Kriegsverletzungen nicht nur ungleich häufiger sind, sondern auch durch die spezifische Seroprophylaxe und Therapie wegen des überaus raschen Infektionsablaufes in einem weit geringeren Prozentsatz günstig beeinflusst werden können. Die kombinierte Impfung gegen Tetanus und Gasbrand in der Armee stellt daher ein erstrebenswertes Ziel dar.

Die Schwierigkeiten bei der Herstellung eines brauchbaren Gasbrandimpfstoffes sind nun aber erheblich und ergeben sich bekanntlich dadurch, dass

1. die Aetiologie des menschlichen Gasbrandes nicht einheitlich ist, sondern durch eine Reihe von Anaerobiern (B. perfringens, Vibrion septique, B. oedematiens Novy, B. histolyticus) verursacht wird, so dass nur polyvalente Impfstoffe in Frage kommen;

2. einzelne dieser Erreger mehrere, von einander unterschiedliche Toxine bilden, deren pathogenetische und immunisierende Bedeutung im einzelnen noch keineswegs abgeklärt ist, so dass die Frage offen bleibt, in welchem Masse diese Gifte bei der Zubereitung von Impfstoffen berücksichtigt werden müssen;

3. sämtliche Gasbrandtoxine eine geringe Stabilität aufweisen und daher bei der Verarbeitung zu Toxoiden leicht geschädigt werden;

4. Gasbrandtoxine im allgemeinen schwache Antigene darstellen, so dass wohl nur von künstlich konzentrierten Toxoiden eine ausreichende Schutzwirkung zu erwarten ist;

5. die Frage, ob eine ausschliesslich antitoxische Immunisierung zur Erzielung eines zuverlässigen Schutzes ausreicht, oder, ob der Impfstoff

auch eine antiinfektiöse Quote enthalten muss, für die verschiedenen Gasbranderreger mit Eindeutigkeit noch nicht entschieden ist.

Für die Immunisierung von kleineren Versuchstieren und von Pferden, die zur Serumgewinnung bestimmt sind, bewährten sich formolisierte Vollkulturen als Impfstoffe anscheinend am besten. Von *Weinberg* und seinen Mitarbeitern (10, 11), *Selevinskaja* (9) u. a. wurde besonders auf die Ueberlegenheit derartiger „Anakulturen" gegenüber den einfachen Formoltoxoiden nachdrücklich hingewiesen. Für die aktive Schutzimpfung vermögen nun aber auch Anakulturen nicht zu befriedigen, da im Meerschweinchenversuch übereinstimmend festgestellt wurde, dass durch die mehrmalige und massive Vorbehandlung nur ein unregelmässiger, kurzfristiger und höchstenfalls gegenüber einigen wenigen letalen Infektionsdosen wirksamer Impfschutz erreicht werden kann (9, 10, 11). Erheblich bessere Immunisierungserfolge werden anscheinend mit Depotimpfstoffen erzielt. So liefern Pferde, die nach *Weinberg und Guillaumie* (12 a—c) mit in Lanolin eingeschlossenen — nicht formolisiertem — Trockentoxin und lebenden Bakterien vorbehandelt werden, besonders hochwertige Gasbrandsera [vgl. auch *Nestoresco* (6)]. *Penfold und Tolhurst* (7a) vermochten fernerhin Mäuse, Ratten und Meerschweinchen mit einem Perfringens-Alaun-Formoltoxoid erfolgreich gegen 2—10 letale Infektionsdosen zu schützen. Derselbe Impfstoff erwies sich diesen Autoren (7b) auch für die menschliche Schutzimpfung als geeignet; indem bei den Geimpften Tierwerte von 0,25—1,0 A. E./1 ccm ermittelt werden konnten. Späterhin vervollkommten *Penfold und Tolhurst* (7c) ihren Impfstoff noch dadurch, dass zur Herstellung des Perfringensalauntoxoids ein Toxinkonzentrat verwendet und das Perfringens- mit einem Tetanusalauntoxoid kombiniert wurde. Mit diesem Impfstoff konnten sowohl im Meerschweinchen- als auch Menschenversuch ausreichende Mengen von Perfringens- und Tetanusantitoxin erzeugt werden. *Nagler* (5) stellte — in Bestätigung der Befunde von *Penfold und Tolhurst* — ebenfalls fest, dass ein mit Alaun gefälltes Perfringenstoxoid zur Immunisierung von Kaninchen weit geeigneter ist als ein ungefälltes und nicht adsorbiertes Toxoid. Schliesslich prüften *Kestermann und Vogt* (3) einen von den Behring-Werken hergestellten, polyvalenten Depotimpfstoff (Formoltoxoide von Fraenkel-, Pararauschbrand-, Oedematiens- und Tetanusbazillen, an Aluminiumhydroxyd adsorbiert) bei einer grösseren Anzahl von freiwilligen Versuchspersonen mit dem Ergebnis, dass gegen Tetanus zwar ausreichend hohe Antitoxinwerte

erreicht wurden, dagegen nicht gegen Gasbrand, da nur bei einem kleinen Teil der Geimpften nachweisbare Antitoxinmengen gegen Oedematiens- und Perfringenstoxin nachzuweisen waren.

Aus den bisherigen Versuchen mit Depotimpfstoffen scheint demnach hervorzugehen, dass eine ausschliesslich antitoxische Gasbrandimpfung Erfolg verspricht, falls Impfstoffe verwendet werden, die einen ausreichend hohen Antigengehalt aufweisen. Es schien daher angezeigt, das von *Penfold und Tolhurst* beim Perfringenstoxin angewandte Impfstoffverfahren auch bei den übrigen Gasbrandtoxinen (Pararauschbrand, Oedematiens Novy, Histolyticus) auf seine Brauchbarkeit zu prüfen. Eine zuverlässige Gasbrandschutzimpfung des Menschen wird nämlich erst dann zur Verfügung stehen, wenn die Impfung gegen alle menschenpathogenen Gasbranderreger gleichermassen wirksam ist.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546501_0013

Experimenteller Teil

I. Herstellung der Impfstoffe

a) Gewinnung der Toxine

Stämme von B. perfringens (Typ A), Vibrion septique, B. oedematiens Novy und B. histolyticus, die sämtliche auf gutes Toxinbildungsvermögen geprüft waren, wurden auf je 6—8 L Bouillon „Vf" (für B. perfringens, Vibrion septique, Histolyticus) bzw. Leberbouillion (für B. oedematiens) verimpft. Die Bebrütungszeiten betrugen für B. perfringens 7—8, für Vibrion septique 17—21, für B. histolyticus 21 Stunden und für B. oedematiens 4 Tage. Sämtliche Kulturen wurden zunächst durch Seitzfilter K, dann E. K. filtriert und die Filtrate unverzüglich auf Toxicität intravenoes im Mäuseversuch ausgewertet.

b) Impfstoff-Fraktionen

Die Toxine wurden in Mengen von je 1000 ccm — unverzüglich nach der Gewinnung — zu den folgenden Impfstoff-Fraktionen verarbeitet:

Fraktion F stellt die Formoltoxoide der Perfringens- (PF), Vibrion septique- (VF), Oedematiens- (NF) und Histolyticusgifte (HF) dar. Sämtliche frisch gewonnenen Toxine erhielten einen Formolzusatz von 3,5 ‰ und wurden bei 37 ° C bis zu ihrer Entgiftung bebrütet. Die Entgiftungszeiten variierten bei den einzelnen Giften und betrugen 5 Tage für Vibrion septique Toxin, 7 Tage für die Oedematiens- und Histolyticus-Toxine und 14 Tage bis 3 Wochen für das Perfringenstoxin. Eine ausreichende Entgiftung wurde dann angenommen, wenn die intraperitoneale Injektion von 0,5—1,0 ccm bei der weissen Maus keinerlei Symptome mehr auslöste.

Fraktion F A_4 wurde dadurch gewonnen, dass die entgifteten Perfringens-, Vibrion septique-, Oedematiens- und Histolyticus-Formoltoxoide durch den Zusatz von je 80 ccm/l L einer sterilen 10 % Kalialaunlösung gefällt, die abzentrifugierten Präcipitate zweimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und hierauf in 1/4 vol. (= 250 ccm) Kochsalzlösung resuspendiert wurden. Das auf diese Weise vierfach konzentrierte

Alauntoxoid entsprach hinsichtlich seiner Herstellungsart dem von *Penfold und Tolhurst* gewonnenen Impfstoff.

Fraktion FA_{10} unterscheidet sich von der vorigen Fraktion lediglich dadurch, dass das mit Alaun gefällte Formoltoxoid nur in $^1/_{10}$ volum aufgenommen und somit um das zehnfache konzentriert wurde.

Fraktion AF_4 wurde dadurch erhalten, dass das native Toxin in der obigen Weise mit Alaun vierfach konzentriert und dann erst mit Formol (4 ‰) in das Toxoid übergeführt wurde.

Fraktion FN_{10} repräsentiert zehnfache Toxoidkonzentrate, die nun aber nicht durch die Ausfällung mit Alaun, sondern mit Natriumsulfat bei 37 ° gewonnen wurden.

Fraktion NF_{10} stellt ein mit Natriumsulfat gewonnenes, zehnfaches Toxinkonzentrat dar, das anschliessend mit Formol (4 ‰) entgiftet wurde.

Aus der Toxicität der Ausgangstoxine kann die Wertigkeit (Anzahl letaler Mäusedosen pro 1 ccm) der aus den vier Gasbrandtoxinen gewonnenen Impfstoff-Fraktionen wie folgt veranschlagt werden:

Perfringens		Vibr. sept.		Oedematiens		Histolyticus	
PF	= 20	VF	= 40	NF	= 40	HF	= 200
PFA_4	= 80	VFA_4	= 160	NFA_4	= 160	HFA_4	= 800
PFA_{10}	= 200	VFA_{10}	= 400	NFA_{10}	= 400	HFA_{10}	= 2000
PAF_4	= 80	VAF_4	= 160	NAF_4	= 160	HAF_4	= 800
PFN_{10}	= 200			NFN_{10}	= 400		
PNF_{10}	= 200	VNF_{10}	= 400	NNF_{10}	= 400		

Die vorstehenden Wertigkeitsberechnungen geben nun aber über den tatsächlichen Antigengehalt der verschiedenen Impfstoff-Fraktionen schon deshalb keinen irgendwie zuverlässigen Aufschluss, weil die Antigenverluste bei der Formolisierung und Konzentrierung keiner Einschätzung zugänglich sind.

2. Monovalente Immunisierung von Meerschweinchen

Die Verträglichkeit und immunisierende Wirksamkeit der 21 verschiedenen Impfstoff-Fraktionen wurde an 123 Meerschweinchen von annähernd demselben Gewicht (350—400 g) geprüft, wobei je 6 (ausnahmsweise nur 3) Tiere mit einer Fraktion durch 2 subcutane Injek-

Tabelle I. **Immunisierung von Meerschweinchen mit Perfringens-Toxoiden**

Tier Nr.	Vorbehandlung			Immunitätsprüfung		
	Fraktion	Dosis *)	Ueberleben bzw. Tod	Lokale Symptome	Ueberleben bzw. Tod	Ueberlebens-raten
P 1	P F	40	ü	+++	ü	
P 2	„	40	ü	++++	ü	
P 3	„	40	†			3/3
P 4	„	40	ü	++++	ü	
P 5	„	40	†			
P 6	„	40	†			
P 7	P F A_4	160	ü	+	ü	
P 8	„	160	†			
P 9	„	160	ü	+++	ü	4/4
P 10	„	160	†			
P 11	„	160	ü	++	ü	
P 12	„	160	ü	+	ü	
P 13	P F A_{10}	400	†			
P 14	„	400	ü	++	ü	
P 15	„	400	†			4/4
P 16	„	400	ü	+	ü	
P 17	„	400	ü	++	ü	
P 18	„	400	ü	+	ü	
P 19	P A F_4	160	†			
P 20	„	160	†			
P 21	„	160	†			2/0
P 22	„	160	†			
P 23	„	160	ü	++++	†	
P 24	„	160	ü	++++	†	
P 25	P F N_{10}	400	†			
P 26	„	400	ü	+++	†	
P 27	„	400	ü	++++	†	3/0
P 28	„	400	†			
P 29	„	400	ü	++++	†	
P 30	„	400	†			
P 31	P N F_{10}	400	†			
P 32	„	400	†			
P 33	„	400	ü	++++	†	4/1
P 34	„	400	ü	+++	†	
P 35	„	400	ü	+++	†	
P 36	„	400	ü	++++	ü	

*) in min. letalen Mäusedosen pro 1 ccm

ü = überlebt

† = Tod

++++ = sehr starke Reaktion

+++ = starke Reaktion

++ = mässig starke Reaktion

\+ = schwache Reaktion

(+) = angedeutete Reaktion

— = fehlende Reaktion

Tabelle II. **Immunisierung von Meerschweinchen mit Vibrion septique-Toxoiden**

Tier Nr.	Vorbehandlung			Immunitätsprüfung		
	Fraktion	Dosis *)	Ueberleben bzw. Tod	Lokale Symptome	Ueberleben bzw. Tod	Ueberlebens-raten
V 1	V F	80	†			
V 2	„	80	ü	+++	†	
V 3	„	80	†			4/1
V 4	„	80	ü	+	ü	
V 5	„	80	ü	++++	†	
V 6	„	80	ü	+++	†	
V 7	V F A_4	320	†			
V 8	„	320	†			
V 9	„	320	†			3/3
V 10	„	320	ü	(+)	ü	
V 11	„	320	ü	(+)	ü	
V 12	„	320	ü	+	ü	
V 13	V F A_{10}	800	†			
V 14	„	800	ü	++	ü	
V 15	„	800	ü	+	ü	5/4
V 16	„	800	ü	+++	†	
V 17	„	800	ü	+	ü	
V 18	„	800	ü	(+)	ü	
V 19	V A F_4	320	†			
V 20	„	320	ü	+	ü *)	
V 21	„	320	†			3/2
V 22	„	320	†			
V 23	„	320	ü	+	ü	
V 24	„	320	ü	+	ü	
V 25	V F N_{10}	800	ü	+++	†	
V 26	„	800	ü	+++	†	
V 27	„	800	ü	++	†	6/1
V 28	„	800	ü	+++	†	
V 29	„	800	ü	+	ü	
V 30	„	800	ü	+++	†	
V 31	V N F_{10}	800	ü	++	ü	
V 32	„	800	ü	+++	†	
V 33	„	800	ü	+++	†	6/2
V 34	„	800	ü	+++	†	
V 35	„	800	ü	++	ü	
V 36	„	800	ü	+++	†	

*) überstand eine 2. Immunitätsprüfung nicht.

Tabelle III. **Immunisierung von Meerschweinchen mit Oedematiens-Toxoiden**

Tier Nr.	Vorbehandlung			Immunitätsprüfung		
	Fraktion	Dosis *)	Ueberleben bzw. Tod	Lokale Symptome	Ueberleben bzw. Tod	Ueberlebens-raten
N 1	N F	80	ü	++	†	
N 2	„	80	ü	(+)	ü	
N 3	„	80	ü	+++	†	5/2
N 4	„	80	†			
N 5	„	80	ü	++	†	
N 6	„	80	ü	—	ü	
N 7	N F A_4	320	ü	++	ü	
N 8	„	320	ü	+++	ü	
N 9	„	320	ü	+++	ü	4/4
N 10	„	320	†			
N 11	„	320	ü	+	ü	
N 12	„	320	†			
N 13	N F A_{10}	800	†			
N 14	„	800	ü	—	ü	
N 15	„	800	ü	—	ü	4/4
N 16	„	800	†			
N 17	„	800	ü	—	ü	
N 18	„	800	ü	—	ü	
N 19	N A F_4	320	ü	++	ü	
N 20	„	320	ü	+++	†	
N 21	„	320	ü	++	ü	4/2
N 22	„	320	†			
N 23	„	320	†			
N 24	„	320	ü	+++	†	
N 25	N F N_{10}	800	ü	++	ü	
N 26	„	800	ü	+++	†	
N 27	„	800	ü	+++	†	6/3
N 28	„	800	ü	++	ü	
N 29	„	800	ü	+++	†	
N 30	„	800	ü	+++	ü	
N 31	N N F_{10}	800	†			
N 32	„	800	†			
N 33	„	800	†			3/2
N 34	„	800	ü	+++	†	
N 35	„	800	ü	+	ü	
N 36	„	800	ü	++	ü	

Tabelle IV. **Immunisierung von Meerschweinchen mit Histolyticus-Toxoiden**

Tier Nr.	Vorbehandlung			Immunitätsprüfung		
	Fraktion	Dosis *)	Ueberleben bzw. Tod	Lokale Symptome	Ueberleben bzw. Tod	Ueberlebensraten
H 1	H F	400	†			1/0
H 2	„	400	†			
H 3	„	400	ü	+++	†	
H 4	H F A_4	1600	ü	+	†	2/0
H 5	„	1600	ü	+	†	
H 6	„	1600	†			
H 7	H F A_{10}	4000	ü	+	†	2/1
H 8	„	4000	ü	(+)	ü	
H 9	„	4000	†			
H 10	H A F_4	1600	ü	+	†	6/4
H 11	„	1600	ü	++	ü	
H 12	„	1600	ü	+	ü	
H 13	„	1600	ü	+	ü	
H 14	„	1600	ü	+	ü	
H 15	„	1600	ü	++	†	

Tabelle V. **Ueberlebensraten bei monovalenter Immunisierung**

Fraktionen	Perfringens	Vibr. sept.	Oedematiens	Histolyticus	Total
F	3/3 *)	4/1	5/2	1/0	13/6
F A_4	4/4	3/3	4/4	2/0	13/11
F A_{10}	4/4	5/4	4/4	2/1	15/13
A F_4	2/0	3/2	4/2	6/4	15/8
F N_{10}	3/0	6/1	6/3	—	15/4
N F_{10}	4/1	6/2	3/2	—	13/5

*) Alle überlebenden Tiere zeigten schwere Lokalreaktionen.

tionen à 1 ccm in Intervallen von 3 Wochen vorbehandelt wurden. 3—4 Wochen nach der letzten Impfung wurde bei sämtlichen überlebenden Tieren die Immunitätsprüfung ausgeführt, die darin bestand, dass 2—4 — ausnahmsweise auch 10 — für Meerschweinchen sicher tödliche Dosen einer 24—48stündigen Leberbouillonkultur in die Muskulatur des Oberschenkels injiziert wurden. Die geprüften Tiere wurden während 4 Wochen zur Feststellung lokaler und allgemeiner Symptome bzw. des Exitus

beobachtet. Nach weitern 3—4 Monaten wurde gelegentlich eine zweite Immunitätsprüfung am kontrolateralen Oberschenkel ausgeführt.

Die erzielten Versuchsergebnisse sind in den Tabellen I—V zusammengestellt und erlauben die folgenden Schlussfolgerungen:

1. Die meisten der verwendeten Impfstoffe erwiesen sich als nicht völlig entgiftet. Die noch vorhandene Giftigkeit äusserte sich vor allem in der zum Teil recht beträchtlichen Anzahl von Impftodesfällen, die sich während der ganzen Immunisierungszeit ereigneten. Stärkere Lokalreaktionen (Oedematoese Schwellung, örtliche und ausgedehnte Nekrosen) wurden dagegen nur beim Perfringensimpfstoff und auch hier nur bei einigen Fraktionen (P F und P F N_{10}) und im Anschluss an die erste Impfinjektion beobachtet. Die Empfindlichkeit der Versuchstiere gegenüber ein und derselben Impfstoff-Fraktion war im übrigen von Tier zu Tier ausserordentlich unterschiedlich; während die einen auf die Impfung nicht oder nur angedeutet reagierten, zeigten andere stärkere und mitunter sogar schwere Reaktionen an der Impfstelle, wurden zunehmend kachektisch oder verendeten unvermittelt bei scheinbar bestem Allgemeinzustand. Durch die Bindung der Toxoide an Alaun konnten jedoch auch nicht völlig entgiftete Formoltoxoide — trotz der hierbei stattfindenden Antigenanreicherung — unschädlicher gemacht werden, so dass von den immunisatorisch wirksamen Impfstoffen die Alauntoxoide (F A_4 und F A_{10}) weitaus die beste Verträglichkeit aufwiesen.

2. Die Angabe von *Penfold und Tolhurst*, wonach sich die immunisierende Wirksamkeit von Perfringenstoxoiden durch die Anreicherung und Bindung mit Alaun erheblich steigern lässt, wurde für sämtliche Gasbrandtoxine bestätigt. Die Ueberlegenheit der Alauntoxoide (Fraktion F A_4 und F A_{10}) über die gewöhnlichen, nicht adsorbierten Formoltoxoide (Fraktion F) zeigte sich bei der Immunitätsprüfung nicht nur in der Geringfügigkeit und Flüchtigkeit der lokalen Reaktionen, sondern vor allem darin, dass in den meisten Fällen sämtliche der vorbehandelten Tiere die Testinfektion überstanden, während die mit gewöhnlichem Toxoid immunisierten Meerschweinchen nur einen mangelhaften Schutz (schwere lokale Reaktion, niedrige Ueberlebensraten) aufwiesen. Ob die Fällung mit Alaun vor oder nach der Formolisierung der Gifte erfolgt, ist anscheinend je nach der Art der Gasbrandtoxine nicht völlig gleichgültig. Beim Perfringens-, Vibrion septique- und Oedematienstoxin wurden die besten Alaunimpfstoffe aus den bereits entgifteten Formol-

toxoiden in Form der Fraktionen FA_4 und FA_{10}) gewonnen und ergab die nachträgliche Formolisierung von Toxinalaunadsorbaten (Fraktion AF_4) durchwegs minderwertigere Impfstoffe. Beim Histolyticustoxin wurden dagegen die umgekehrten Verhältnisse nachgewiesen, indem hier nur die Fraktion AF_4 ausreichend immunisierte (vgl. die Uebersichtstabelle V). Ob dieser Feststellung eine prinzipielle Bedeutung zukommt, bleibt jedoch einstweilen fraglich. Die nach der Vorschrift von *Penfold und Tolhurst* vierfach konzentrierten Alauntoxoide (Fraktion FA_4) immunisierten im allgemeinen ebenso zuverlässig wie die stärker eingeengten Impfstoffe (Fraktion FA_{10}). Bei den gegen B. oedematiens immunisierten Tieren wurde allerdings beobachtet, dass die höher konzentrierte Impfstoff-Fraktion (NFA_{10}) insofern noch zuverlässiger als das schwächere Alauntoxoid (NFA_4) schützte, als in diesem Fall die sonst stets bei der Immunitätsprüfung auftretenden Lokalreaktionen völlig ausblieben. Gänzlich unbefriedigende Impferfolge wurden schliesslich mit Toxin- bzw. Toxoidkonzentraten, die durch die Ausfällung mit Natriumsulfat gewonnen wurden, erzielt. Derartige Impfstoffe (Fraktionen FN_{10} und NF_{10}) immunisierten — trotz ihres berechnungsgemäss zehnfach höheren Antigengehaltes — eher schlechter als die nicht konzentrierten Formoltoxoide (vgl. Uebersichtstabelle V). *Das Ergebnis dieser monovalenten Immunisierungsversuche kann demnach dahin zusammengefasst werden, dass es gelingt, Meerschweinchen durch die Vorbehandlung mit Alauntoxoiden einen bemerkenswerten Schutz gegen alle menschenpathogenen Gasbranderreger zu verleihen. Der Grad der erzielten Immunität ist nicht absolut, da höchstenfalls ein Schutz gegen 2—4 letale Infektionsdosen erreicht wird und örtliche Reaktionen an der Injektionsstelle meistens nicht verhindert werden können.* Ueber die Dauerhaftigkeit des immunen Zustandes wurden keine systematischen Untersuchungen angestellt; nach dem Ausfall der zweiten Immunitätsprüfung kann lediglich geschlossen werden, dass die Versuchstiere noch nach 3—4 Monaten Reinfektionen mit sicher tödlichen Infektionsdosen widerstehen, wobei jedoch wiederum stärkere örtliche Reaktionen nicht ausgeschlossen sind.

3. Polyvalente Immunisierung von Meerschweinchen

Zu diesen Versuchen diente ein polyvalenter Mischimpfstoff der folgenden Zusammensetzung:

1/4 P F A_4	enthaltend	80	let.	Mäusedosen / 1 ccm	
1/4 V F A_4	„	160	„	„	„
1/4 N F A_4	„	160	„	„	„
1/4 H A F_4	„	800	„	„	„

Mit diesem Impfstoff wurden insgesamt 60 Meerschweinchen von 350—400 g durch 2 subcutane Impfinjektionen im Intervall von 3 Wochen vorbehandelt, wobei die Tiere des einen Tierkollektives (Nr. 1—30) je 2×1 ccm, diejenigen des andern (Nr. 31—60) je 2×2 ccm Impfstoff erhielten. Von den einzelnen Impfstoff-Fraktionen wurde demnach im einen Fall nur ein Viertel, im andern nur die Hälfte der bei der monovalenten Immunisierung verwendeten Impfstoffmenge verabreicht. 4 Wochen nach der letzten Impfung wurden in jedem Kollektiv je 6 Tiere gegenüber 2—4 sicher tödlichen Infektionsdosen von B. perfringens, Vibrion septique, B. oedematiens und B. histolyticus sowie gegenüber einer Mischkultur dieser Erreger intramuskulär auf Immunität geprüft. Bei sämtlichen Tieren, welche die Testinfektion überstanden, wurden in Abständen von 2—3 Wochen noch eine 2., 3. und 4. Immunitätsprüfung jeweils mit einem andern Gasbranderreger ausgeführt, in der Absicht, die Polyvalenz der erzeugten Immunität bei jedem einzelnen Tier festzustellen.

Ueber den Ausfall dieser Immunisierungsversuche geben die Tabellen VI, VII und VIII Auskunft.

Die Verwendung von länger gelagerten und daher auch vollständiger entgifteten Impfstoff-Fraktionen wirkte sich insofern vorteilhaft aus, als die Vorbehandlung zu keinen stärkeren Impfschädigungen führte und nur den Verlust eines einzigen Versuchstieres zur Folge hatte. Dagegen waren die Impferfolge, die mit dem Mischimpfstoff in beiden Versuchsserien erzielt wurden, deutlich ungünstiger wie bei der monovalenten Immunisierung. Ausnahmslos geschützt waren die Tiere nur gegenüber der Testinfektion mit Vibrion septique, während die Immunitätsprüfung mit Kulturen von B. perfringens nur in durchschnittlich 75 %, von B. histolyticus in 59 % und von B. oedematiens sogar nur in 43 % überstanden wurde (vgl. Tab. VIII). Der Umstand, dass die Ueberlebensraten bei den verschiedenen Immunitätsprüfungen mit ein und demselben Erreger zum Teil beträchtlich variierten, dürfte auf versuchstechnische Mängel, nämlich auf die Schwierigkeit, die Prüfungsdosis konstant auf den gewünschten Wert von 2—4 min. let. D. einzustellen, zurückzuführen

Tabelle VI. **Polyvalente Immunisierung. 1. Versuchsserie** (2 Impfdosen à 1 ccm)

Tier Nr.	1. Impfung					2. Impfung				3. Impfung				4. Impfung			
	P.	V.	O.	H.	G.	P.	V.	O.	H.	P.	V.	O.	H.	P.	V.	O.	H.
1	†																
2	†																
3	ü								ü		ü					†	
4	ü						ü					÷					ü
5	ü								ü		ü					ü	
6	ü						ü					÷					ü
7	ü								ü		ü					†	
8		ü				ü						÷					ü
9		ü				ü							÷				ü
10		ü				ü							÷				ü
11		ü						†									
12		ü						†									
13		ü						†									
14			ü				ü			ü							ü
15			†														
16			†														
17			ü				ü			†							
18			ü						ü	ü				†			
19			†														
20			ü						ü	ü				ü			
21				†													
22				†													
23				†													
24				†													
25				†													
26				†													
27					†												
28					†												
29					†												
Ueberlebensraten	7/5	6/6	7/4	6/0	3/0	3/3	4/4	3/0	5/5	4/3	3/3	÷	÷	2/1		3/1	6/6

P = Perfringens
V = Vibr. septique
O = Oedematiens
H = Histolyticus
G = Gemisch (P + V + N + H)
ü = überlebt
† = Tod
÷ = nicht verwertbar bei zweifelhaften Kontrollen

Tabelle VII. **Polyvalente Immunisierung. 2. Versuchsserie.** (2 Impfdosen à 2 ccm)

Tier Nr.	1. Impfung					2. Impfung				3. Impfung				4. Impfung			
	P.	V.	O.	H.	G.	P.	V.	O.	H.	P.	V.	O.	H.	P.	V.	O.	H.
31	†																
32	†																
33	†																
34	ü							ü			ü						ü
35	ü						ü					ü					ü
36	ü						ü					ü					ü
37	ü						ü					ü					ü
38		ü				ü							ü				ü
39		ü				ü							ü				†
40		ü				ü							ü				ü
41		ü						†									
42		ü						†									
43		ü						ü		ü							ü
44			†														
45			†														
46			†														
47			†														
48			†														
49			†														
50			ü						ü	ü					ü		
51				†													
52				†													
53				†													
54				†													
55				†													
56				ü		ü					ü					ü	
57				†													
58					†												
59					†												
60					†												
Ueberlebensraten	7/4	6/6	7/1	7/1	3/0	4/4	3/3	4/2	1/1	2/2	2/2	3/3	3/3		1/1	1/1	8/7

Tabelle VIII. **Ueberlebensraten bei polyvalenter Immunisierung**

	Perfringens	Vibr. sept.	Oedematiens	Histolyticus
I. Versuchsserie				
1. I. P.	7/5	6/6	7/4	6/0
2. I. P.	3/3	4/4	3/0	5/5
3. I. P.	4/3	3/3	÷	÷
4. I. P.	2/1	÷	3/1	6/6
Total	16/12	13/13	13/5	17/11
II. Versuchsserie				
1. I. P.	7/4	6/6	7/1	10/1
2. I. P.	4/4	3/3	4/2	1/1
3. I. P.	2/2	2/2	3/3	3/3
4. I. P.	—	1/1	1/1	8/7
Total	13/10	12/12	15/7	22/12
I. + II. Versuchsserie				
Total	29/22	25/25	28/12	39/23
% der überlebenden Versuchstiere Total	75%	100%	43%	59%

sein. Zur Erklärung der namentlich gegen B. perfringens und B. oedematiens geringeren Wirksamkeit des polyvalenten Mischimpfstoffes könnten zwei Umstände in Betracht gezogen werden, nämlich 1. dass die völlige Entgiftung des Impfstoffes auch dessen immunisierendes Vermögen herabsetzt und 2. dass der Antigengehalt in den Perfringens- und Oedematiensanteilen des Impfstoffes für eine zuverlässige Immunisierung zu klein bemessen ist und daher nur noch eine bestimmte Quote der Versuchstiere zu immunisieren vermag. Die erste Annahme erscheint schon deshalb unwahrscheinlich, weil der gänzlich entgiftete Vibrion-septique-Impfstoff durchwegs die besten Immunisierungserfolge ergab und auch sonst die Beobachtung gemacht wurde, dass eine völlig reaktionslose Vorbehandlung die beste Gewähr für die Ausbildung einer zuverlässigen Immunität bietet. Nicht völlig entgiftete Impfstoffe führen, wie immer wieder beobachtet werden konnte, zu chronischen Intoxikationen, bei welchen die Schädigung der Leber und des Zentralnervensystems im Vordergrund steht und die wohl auch zur Folge haben, dass die Antikörperbildung erheblich gelähmt wird. Für das teilweise Versagen des

polyvalenten Impfstoffes ist demnach wohl in erster Linie die zu geringe Konzentration einzelner Impfstoffkomponenten verantwortlich. Dass in der 2. Versuchsserie, in welcher die doppelte Impfstoffmenge zur Anwendung kam, keine besseren, sondern eher schlechtere Ergebnisse erzielt wurden, ist wohl darauf zurückzuführen, dass die vergrösserte Impfstoffmenge von den meisten Tieren nicht völlig reaktionslos bzw. ohne Schädigung toleriert wurde.

Das Gesamtergebnis dieser polyvalenten Immunisierungsversuche ist übrigens nicht völlig unbefriedigend, da — wie aus der nachfolgenden Zusammenstellung (Tab. IX) ersichtlich ist — rund die Hälfte der Versuchstiere die erste und annähernd ein Drittel die zweite, dritte und vierte Immunitätsprüfung überstanden.

Tabelle IX. **Polyvalente Immunisierung**

	Total der überlebenden Tiere				
	Vorbehandelt	1. I. P.	2. I. P.	3. I. P.	4. I. P.
I. Versuchsserie	29	15	12	11	8
II. Versuchsserie	30	12	10	10	9
Total (I+II)	59	27	22	21	17

I. P. = Immunitätsprüfung

Besprechung der Versuchsergebnisse

Für sämtliche Verfahren der aktiven Immunisierung gegen Anaerobeninfektionen war bisher die Empirie massgebend. Dieser Umstand erklärt sich aus der Tatsache, dass die sicheren Grundlagen für eine Gasbrandschutzimpfung grösstenteils fehlen. Schon die alte Streitfrage, ob die tier- und menschenpathogenen Anaerobier als toxigene Saprophyten oder als toxinbildende Infektionserreger aufzufassen sind, ist immer noch nicht endgültig abgeklärt. Es besteht daher nach wie vor Unsicherheit darüber, ob ein rein antitoxischer Schutz ausreicht, oder, ob auch eine antiinfektiöse Immunität angestrebt werden soll. Auf Grund der Immunisierungserfolge, die mit den verschiedenartigsten Impfstoffen — native Ectotoxine, Anatoxine, Anakulturen, Endotoxine und Aggressine — erzielt wurden, lässt sich diese Frage schon deshalb nicht eindeutig und

generell entscheiden, weil die in den Impfstoffen vorhandenen Antigene nur unzureichend charakterisiert sind*), die Immunisierungsergebnisse eine klare Ueberlegenheit eines Impfstoffes nicht erkennen lassen und schliesslich die für einen Erreger festgestellten Immunitätsverhältnisse auch nicht ohne weiteres auf andere übertragen werden dürfen. Es wäre daher dringend erwünscht, dass der Immunitätsmechanismus bei Anaerobeninfektionen eingehender als bisher analysiert würde.

Für die menschliche Schutzimpfung dürften nun allerdings a priori nur antitoxische (ecto- event. auch endotoxinhaltige) Impfstoffe bzw. Formoltoxoide in Betracht kommen, da die Verimpfung von sporenhaltigem Material in Form von Bazillensuspensionen bzw. Anakulturen schon aus Sicherheitsgründen abgelehnt werden müsste. Die grundsätzliche Eignung von Perfringens-, Vibrion septique-, Oedematiens- und Histolyticus-Anatoxinen zur aktiven Immunisierung von Meerschweinchen, Kaninchen, Schafen und Pferden ist nun zwar durch die Untersuchungen von *Weinberg* und Mitarbeitern (10, 11, 12), *Dalling und Mason* (1), *Penfold und Tolhurst* (7a, c), *Nagler* (5), *Kolmer* (4) u. a. sichergestellt; die erzielten Immunisierungserfolge vermochten jedoch schon deshalb nicht zu befriedigen, weil — wie namentlich im Meerschweinchenversuch festgestellt wurde — ein ausreichender Impfschutz erst durch die Verabreichung unverhältnismässig grosser Impfstoffdosen zustande kommt und ausserdem meist nur eine beschränkte Anzahl der Versuchstiere eine relative Immunität erwirbt. *Weinberg* und seine Mitarbeiter (11) führen diese Insuffizienz der Anatoxinimpfung einerseits auf den Mangel einer antiinfektiösen Quote im Impfstoff und anderseits auf die geringe Formolresistenz der Vibrion septique- und Histolyticustoxine zurück. Die vorzüglichen Immunisierungserfolge, die *Penfold und Tolhurst* (7a, c) mit einem konzentrierten Perfringensalauntoxoid im Mäuse-, Ratten- und Meerschweinchen-, und *Nagler* (5) im Kaninchenversuch erzielten, scheinen nun aber doch dafür beweisend, dass eine zuverlässige Immunisierung mit adsorbierten Toxoidkonzentraten möglich ist, eine Ansicht, der sich neuerdings auch *Kolmer* (4) angeschlossen hat. In den eigenen Versuchen konnten die Befunde von *Penfold und*

*) Diese Feststellung trifft nicht nur für die verschiedenen O- und H-antigenhaltigen Endotoxine (8, 2) und Aggressine, sondern auch für die Ectotoxine zu, die — wie schon von v. Wassermann hervorgehoben wurde — in die Klasse der übrigen Ectotoxine mit Sicherheit nicht eingereiht werden können.

Tolhurst nicht nur bestätigt werden, sondern es gelang auch der Nachweis, dass konzentrierte Alauntoxoide auch bei der aktiven Immunisierung gegen die übrigen menschenpathogenen Anaerobier (Vibrion septique, B. oedematiens Novy, B. histolyticus) als Impfstoffe den gewöhnlichen Anatoxinen bedeutend überlegen sind. Die Tatsache, dass die besten Immunisierungserfolge gegen Vibrion septique erzielt wurden, ist besonders bemerkenswert, da die Immunisierung von Meerschweinchen gegen diesen Erreger erfahrungsgemäss besondere Schwierigkeiten bereitet [vgl. *Witte und Schaaf* (13)]. Von Interesse ist fernerhin die Feststellung, dass die von *Penfold und Tolhurst* angegebene Impfstofftechnik für die Gewinnung von Histolyticusimpfstoffen versagt und mit Vorteil dahin zu modifizieren ist, dass die Adsorption an Alaun vor der Formolisierung vorgenommen wird, eine technische Modifikation, die auch bei der Herstellung von Vibrion-septique-Impfstoffen angewendet werden kann. Der Vorteil dieser Modifikation ist wohl darin begründet, dass die nativen Toxine von Vibrion septique und besonders von B. histolyticus gegen Formol wenig resistent sind [*Weinberg und Barotte* (11)], durch die vorgängige Bindung an Alaun jedoch gegenüber dieser Schädigung weitgehend stabilisiert werden. Weiterhin scheint aus den vorliegenden Untersuchungen hervorzugehen, dass die immunisierende Wirksamkeit von antitoxischen Gasbrandimpfstoffen nicht nur von der Toxoidkonzentration abhängig ist, sondern auch durch die Bindung des Toxoids an ein Adsorbens erheblich begünstigt wird, eine Feststellung, die schon *Nagler* nicht entgangen ist. Die klare Ueberlegenheit adsorbierter Toxoide ist wohl nicht nur die Folge der Depotwirkung dieser Impfstoffe, sondern auch einer direkten Aktivierung der Antigene durch unspezifische Schleppersubstanzen. Schliesslich ist der Nachweis, dass Alauntoxoide auch in Form von polyvalenten Mischimpfstoffen gegen sämtliche menschenpathogenen Gasbranderreger in befriedigender Weise zu immunisieren vermögen insofern bemerkenswert, als die bisherigen Versuche einer polyvalenten Immunisierung mit gewöhnlichen Formoltoxoiden [*Weinberg und Prévot* (10), *Weinberg und Barotte* (11), *Kolmer* (4)] kaum nennenswerte Erfolge zeitigten.

Zusammenfassung

1. Die Angabe von *Penfold und Tolhurst*, wonach Meerschweinchen durch die Vorbehandlung mit kleinen Mengen von Perfringensalauntoxoid gegenüber einer nachfolgenden Infektion zuverlässig geschützt werden können, wurde bestätigt.

2. Die Immunisierung mit Alauntoxoiden erwies sich auch als erfolgreich gegenüber den andern menschenpathogenen Gasbranderregern (Vibrion septique; B. oedematiens Novy; B. histolyticus).

3. Mit einem polyvalenten Alauntoxoid-Mischimpfstoff gelang es, Meerschweinchen in einem höheren Prozentsatz gegen sämtliche menschenpathogenen Gasbranderreger zu schützen.

4. Die Ueberlegenheit der Alauntoxoide über die nicht konzentrierten bzw. adsorbierten Toxoide zeigte sich darin, dass in den meisten Fällen sämtliche der vorbehandelten Tiere 2—4 sicher tödliche Infektionsdosen überstanden und im einen Fall (Vibrion septique) auch keine Lokalreaktionen aufwiesen.

Literatur

Dalling und Mason, J. Path. a. Bact. *29*, 129 (1926).

Henderson, Brit. J. exp. Path. *15*, 166 (1934); *16*, 393 (1935); *18*, 224 (1937).

Kestermann und Vogt, Klin. Wschr. 1940, p. 1009.

Kolmer, J. Immun. *43*, 289 (1942).

Nagler, J. Path. a. Bact. *52*, 105 (1941).

Nestoresco, C. r. Soc. Biol. *133*, 743 (1940).

Penfold und Tolhurst, a) Med. J. Austral. *24*, 982 (1937); b) Med. J. Austral *25*, 604 (1938); c) J. Path. a. Bact. *52*, 187 (1941).

Robertson und Weil, Brit. J. exp. Path. *11*, 14 (1930).

Selevinskaja, Zbl. Bakt. Orig. I, *134*, 250 (1935).

Weinberg und Prévot, C. r. Acad. Sci. *179*, 227 (1924); C. r. Soc. Biol. *92*, 1484 (1925).

Weinberg und Barotte, C. r. Soc. Biol. *94*, 312 (1926); C. r. Soc. Biol. *100*, 21, 94 (1929); Ann. Inst. Pasteur *43*, 453 (1929).

Weinberg und Guillaumie, a) C. r. Soc. Biol. *119*, 719 (1935); b) Rev. Imm. 2, 513 (1936); c) Rev. Imm. *3*, 485 (1937).

Witte und Schaaf, Arch. f. wiss. u. prakt. Tierheilk. *63*, 239 (1931).